

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



**Eur päisches Patentamt**  
**Europ an Patent Office**  
**Office européen des brevets**

(11) Numéro de publication:

**0 402 205**  
**A1**

(12)

# **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(21) Numéro de dépôt: 90401459.4

(51) Int. Cl. 5: **C07K 3/28, C07K 15/06,**  
**A61K 37/02**

(22) Date de dépôt: 31.05.90

(30) Priorité: 08.06.89 FR 8907586

(43) Date de publication de la demande:  
 12.12.90 Bulletin 90/50

(84) Etats contractants désignés:  
 AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: **CENTRE REGIONAL DE**  
**TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE**  
 19-21 rue Camille Guérin  
 F-59012 Lille(FR)

(72) Inventeur: **Dernis, Dominique**  
 59 route de Menin  
 F-59520 Marquette-Lez-Lille(FR)  
 Inventeur: **Burnouf, Thierry**  
 5 rue du Dr. Schaffner  
 F-59136 Wavrin(FR)

(74) Mandataire: **Lepeudry-Gautherat, Thérèse et**  
**al**  
**CABINET LEPEUDRY 6 rue du Faubourg**  
**St-Honoré**  
**F-75008 Paris(FR)**

(54) **Procédé de préparation de solutions d'albumine purifiée.**

(57) L'invention concerne un procédé de préparation d'albumine purifiée à partir d'une solution physiologique humaine ou animale, comme un plasma ou une fraction de plasma.

Le procédé comprend un traitement de délipidation par un détergent anionique et deux étapes de séparation par chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

La mise en oeuvre du procédé de l'invention permet d'obtenir une solution d'albumine de haute pureté, stable, et à usage thérapeutique.

**EP 0 402 205 A1**

## Procédé de préparation de solutions d'albumine purifiées

L'invention concerne la préparation de solutions d'albumine purifiées à partir d'une solution physiologique humaine ou animale, notamment par purification par chromatographie d'échange d'ions.

On connaît depuis de nombreuses années différents types de procédés pour préparer des solutions d'albumine injectables, à partir du sérum normal. Ceux-ci comprennent la précipitation à l'éthanol, suivant les méthodes classiques de Cohn ou de Kistler et Nitschmann, et différents schémas de purification comprenant plusieurs types de colonnes de chromatographie. Le matériau de départ peut être un plasma frais ou congelé, ou un surnageant de cryoprécipité, ou une fraction déjà dépourvue de certaines protéines.

La mise au point d'un schéma de purification hautement performant a été décrite par Curling, Berglöf, Lindquist et Eriksson (Vox Sanguinis 33, 1977, 97-107 et dans le brevet US. 4 086 222). Cette technologie développée en particulier par la Société Pharmacia (Pharmacia Fine Chemicals - Uppsala - Suède) qui fournit les différents types de résines de chromatographie, est largement utilisée dans plusieurs centres de transfusion sanguine (en Europe, au Canada, en Australie ...)

Toutefois ces procédés de purification n'assurent pas l'élimination totale de certaines molécules contaminantes de nature lipoprotéique, en particulier les  $\alpha$ -lipoprotéines, en raison de leurs analogies biochimiques avec l'albumine.

Ces molécules se révèlent instables au chauffage et semblent responsables, après dénaturation, de l'apparition soit de particules soit d'une certaine turbidité dans les solutions d'albumine au cours de la pasteurisation, ce qui les rend impropres à l'utilisation clinique. Ces contaminants sont difficiles à éliminer par des méthodes classiques basées sur des différences de charges ou de poids moléculaires.

C'est pourquoi la Demanderesse a mis au point un procédé d'extraction et d'élimination de ces contaminants lipoprotéiques, plus efficace que les étapes chromatographiques additionnelles décrites dans l'art antérieur. Ce procédé comprend une étape de délipidation de la solution d'albumine utilisant de préférence un détergent anionique non dénaturant.

Le procédé selon la présente invention comprend également préférentiellement deux étapes de séparation par chromatographie sur résine échangeuse d'ions et élution de l'albumine adsorbée, la première assurant une séparation classique de l'albumine, la seconde permettant d'éliminer le détergent et les produits résultant de la délipidation et de récupérer une solution d'albumine hautement

purifiée. Celle-ci offre l'avantage d'être stable à la pasteurisation et à la conservation.

Le traitement de délipidation de la présente invention consiste en un contact prolongé de la solution d'albumine éluée de la première colonne de chromatographie avec un détergent anionique. Ce détergent peut être choisi parmi les détergents du type Tween ou Triton. En particulier, on a obtenu de très bons résultats avec le Tween 80 quand sa concentration est comprise entre 0,05 et 0,25 g par g de protéines et ajustée à 1 volume de Tween 80 pour 8 volumes de solution d'albumine.

Ce traitement de délipidation peut être mis en oeuvre par un contact assez long, plus particulièrement de plus de 5 heures, à 25°C ou par un contact plus court mais à température élevée, plus particulièrement un contact de 1 heure à 60°C. Dans ce dernier cas il est nécessaire d'ajouter un stabilisant de l'albumine comme le caprylate de sodium.

Le procédé de la présente invention peut être mis en oeuvre sur une solution physiologique quelconque, humaine ou animale, qui contient de l'albumine, comme un plasma total frais ou congelé, ou un surnageant de cryoprécipité ; on peut aussi utiliser un surnageant après précipitation du plasma à l'éthanol selon les méthodes de Cohn ou de Kistler et Nitschmann ou encore une autre fraction de plasma dont on a déjà prélevé d'autres protéines utiles. Le matériau de départ peut aussi être dérivé du placenta.

Avant d'être appliquée sur la première colonne de chromatographie, cette solution de départ contenant l'albumine est ajustée à un taux de protéines compris entre 15 et 18 g/l. à une conductivité de 1,5 à 2 mS (milli-Siemens) par de l'acétate de sodium et à un pH compris entre 5,0 et 8,0 par l'acide acétique ou la soude.

La solution d'albumine ainsi ajustée est appliquée sur une première colonne de chromatographie sur résine échangeuse d'ions. On obtient une bonne adsorption sélective de l'albumine avec le DEAE-sépharose, par exemple sur une colonne de "DEAE-sépharose CL-6B fast flow" fourni par Pharmacia.

L'albumine adsorbée sur la colonne de chromatographie est éluée par un abaissement du pH du tampon à une valeur au moins inférieure au pH<sub>i</sub> (point isoélectrique, environ égal à 4,7) et plus particulièrement comprise entre 4,0 et 4,7.

Le procédé de la présente invention comprend, après le traitement de délipidation, une séparation sur une deuxième colonne de chromatographie, de même nature et dans les mêmes conditions que la première.

Cette seconde chromatographie permet une élimination du Tween et des contaminants lipoprotéiques. Pour assurer leur élimination complète, la colonne portant l'albumine adsorbée subit plusieurs lavages successifs avec du tampon, avant l'élution de l'albumine par abaissement du pH à une valeur de 4 à 4,7, comme décrit plus haut.

La solution d'albumine éluée est ensuite ajustée à une concentration finale comprise entre 4 et 25 % dans des conditions physiologiques compatibles avec un usage thérapeutique et plus particulièrement à un pH compris entre 6,5 et 7,0 et à une osmolarité de 80 à 350 mosM.

Le procédé selon la présente invention comprend ensuite une pasteurisation de la solution d'albumine préalablement stabilisée par addition de caprylate de sodium à une concentration de 0,012 à 0,015 g/g d'albumine. Cette pasteurisation est effectuée par un chauffage à plus de 60 °C pendant au moins 10 heures. Après ce traitement, les solutions restent parfaitement claires et sont stables à la conservation.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la solution d'albumine ne subit pas de pasteurisation et n'est pas additionnée de caprylate de sodium ; dans ce cas, elle subit un traitement d'inactivation virale, selon des méthodes classiques, par solvant-détergent.

La présente invention concerne également les solutions d'albumine purifiées par le procédé décrit plus haut, lesdites solutions étant particulièrement adaptées à un usage thérapeutique.

Les solutions d'albumine purifiées non pasteurisées peuvent également être utilisées avantageusement pour les cultures in vitro de cellules eucaryotes.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

La figure 1 illustre ces exemples et représente des immunoélectrophorèses de la solution d'albumine avant et après le traitement de délipidation.

#### EXEMPLE 1 :

Le matériau de départ est par exemple un surnageant I + II + III de Cohn (après précipitation du plasma à l'éthanol selon la méthode classique de Cohn et al. J. Am. Chem. Soc. 68, 1946, 459-475) ou son équivalent A + I selon la méthode classique de Kistler et Nitschmann (Vox Sanguinis 7, 1962, 414-424). Ce matériau est dialysé contre de l'eau distillée osmosée (de qualité "préparation pour injection").

La solution est ajustée à une concentration en protéines de 15 à 18 g par litre.

Le pH est ajusté à 6,0 ou à une valeur comprise entre 5,0 et 8,0 en fonction du matériau de

départ, avec de l'acide acétique ou de la soude. La conductivité de la solution est ajustée à 1,8 mS ou à une valeur comprise entre 1,5 et 2,0 mS, par de l'acétate de sodium.

#### a - Chromatographie

La solution est soumise à une première étape de chromatographie sur colonne de DEAE-sépharose CL6B - fast flow (Pharmacia). La colonne de chromatographie est équilibrée par un tampon d'acétate de sodium à pH 6,0. L'équilibrage du gel est atteint lorsque le tampon qui s'écoule de la colonne présente une conductivité de  $1,8 \pm 0,1$  mS et un pH de  $6,0 \pm 0,1$ .

L'échantillon est injecté, à raison de 485 g de protéines pour 20 litres de gel. Le débit est réglé à environ 100 l/h. Après passage de l'échantillon, le retour à la ligne de base est assuré par le tampon d'équilibrage.

Ensuite, un abaissement du pH à 5,25 permet la désorption et l'élution de la transferrine.

L'albumine est ensuite éluée de la colonne par un abaissement du pH à une valeur au moins inférieure à son  $pH_i$  (4,7); le tampon acétate est ajusté à un pH de 4,5 et une conductivité de 1,8 mS.

La solution d'albumine éluée est concentrée à environ 100 à 150 g/l puis dialysée contre de l'eau pour éliminer l'acétate.

La solution d'albumine est ensuite ajustée à un pH de 7,0 et une osmolarité de 250 à 350 mosM ; sa concentration est ajustée soit à 4 ou 5 % soit à 20 ou 25 %.

#### b. Traitement de délipidation

La solution d'albumine est additionnée de caprylate de sodium à raison de 0,015 g de caprylate par g de protéines, comme agent stabilisateur pour le chauffage et la pasteurisation ultérieurs (quand ces opérations ne doivent pas être effectuées, on n'ajoute pas de caprylate). La solution est passée sur un filtre stérilisant.

Le Tween 80 est dilué à 10 % dans de l'eau stérile chaude pour être incorporé dans la solution d'albumine à raison de 0,5 % (v/v) pour une solution d'albumine à 4 %, ou de 2,5 % (v/v) pour une solution d'albumine à 20 % (les v.v. sont exprimés en v de Tween pur/vol. de solution d'albumine).

Ensuite le mélange est - soit chauffé à 60 °C pendant au moins une heure

- soit laissé en contact, sous légère agitation, à 25 °C pendant au moins 5 heures.

### c. Chromatographie

On utilise une colonne de DEAE - sépharose CL6B dans des conditions identiques à celles utilisées pour la première étape de chromatographie

L'albumine s'adsorbe sur la colonne et le Tween 80 est éliminé dans le filtrat, en même temps que les composés de nature lipidique comme l' $\alpha$ -lipoprotéine.

La colonne est rincée avec 10 fois son volume de charge de tampon pour assurer l'élimination complète du Tween 80.

L'albumine est éluée dans les mêmes conditions que précédemment, par abaissement du pH du tampon à 4,5.

La solution d'albumine éluée est ensuite ajustée à des conditions physiologiques c'est-à-dire à un pH de 6,5 à 7,0 et une osmolarité de 80 à 350 mosm. La solution est filtrée, répartie en flacons et stérilisée par un chauffage à plus de 60°C pendant au moins 10 heures (selon les règles imposées par la pharmacopée).

Cette pasteurisation peut être remplacée par un traitement classique d'inactivation virale au solvant-détergent.

#### EXEMPLE 2 : Mise en évidence de l'efficacité du procédé par analyse en immunoélectrophorèse

La qualité de la solution d'albumine finale est comparée à celle de la solution issue de la première colonne de chromatographie. Le résultat est présenté sur la figure 1.

La figure 1 représente 3 immunoélectrophorèses de solutions d'albumine (dans la partie supérieure) en parallèle avec un plasma témoin (dans la partie inférieure).

1A : immunoélectrophorèse en présence d'un antisérum anti-plasma humain total, avant traitement de la solution d'albumine au Tween 80.

1B : même électrophorèse qu'en A, en présence d'un immunosérum spécifique anti-ApoA.

1C : immunoélectrophorèse en présence d'un antisérum anti-plasma humain total, après traitement de la solution d'albumine au Tween 80.

La figure 1B doit être comparée à la figure 1A et permet d'identifier l'arc d' $\alpha$ -lipoprotéine.

La figure 1C montre la disparition de l'arc d' $\alpha$ -lipoprotéine dans la solution après traitement au Tween 80.

#### Revendications

1.- Procédé de préparation d'albumine purifiée à partir d'une solution physiologique humaine ou animale en contenant, caractérisé en ce qu'il com-

prend un traitement de délipidation.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le traitement de délipidation est réalisé avec un détergent anionique non dénaturant.

3.- Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend deux étapes de séparation par chromatographie sur résine échangeuse d'ions et élution de l'albumine adsorbée.

4.- Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que le traitement de délipidation est mis en oeuvre sur l'albumine éluée de la première chromatographie.

5.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que le traitement de délipidation consiste en un contact de plus de cinq heures à 25°C avec le détergent.

6.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que le traitement de délipidation consiste en un contact d'environ 1 heure à 60°C avec le détergent et en présence de caprylate de sodium comme stabilisant.

7.- Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que le détergent est du Tween 80 à une concentration comprise entre 0,05 g et 0,25 g par g de protéines.

8.- Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la concentration du Tween 80 est ajustée à un rapport de 1 volume de Tween 80 pour 8 volumes d'albumine.

9.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la solution physiologique de départ est un plasma total ou une fraction de plasma surnageant de cryoprécipité ou surnageant après précipitation à l'éthanol, ou toute autre fraction plasmatique contenant de l'albumine.

10.- Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la solution de départ est ajustée à un taux de protéines compris entre 15 et 18 g/l.

11.- Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que la solution de départ est ajustée à une conductivité comprise entre 1,5 et 2 mS par l'acétate de sodium et à un pH compris entre 5,0 et 8,0 par l'acide acétique.

12.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la solution de départ est injectée sur une première colonne de chromatographie sur résine échangeuse d'ions de type DEAE-sépharose qui adsorbe l'albumine.

13.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que l'albumine adsorbée sur la chromatographie est éluée par un abaissement du pH du tampon à une valeur comprise entre 4 et 4,7.

14.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la solution d'albumine ayant subi le traitement de

délipidation selon les revendications 4 à 8 est injectée sur une deuxième colonne de chromatographie sur résine échangeuse d'ions de type DEAE-sépharose qui adsorbe l'albumine et élimine le Tween et les produits résultant du traitement de

5

15.- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'élimination complète du Tween et des produits résultant de la délipidation est assurée par une série de lavages successifs de la chromatographie avec du tampon.

10

16.- Procédé selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce que l'albumine adsorbée sur la chromatographie est éluée par un abaissement du pH du tampon à une valeur comprise entre 4 et

15

17.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 caractérisé en ce que la solution d'albumine éluée est ajustée à une concentration finale comprise entre 4 et 25 %, dans des conditions physiologiques compatibles avec un usage thérapeutique.

20

18.- Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la solution d'albumine est ajustée à un pH compris entre 6,5 et 7,0 et à une osmolarité de 80 à 350 mosM.

25

19.- Procédé selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce que la solution d'albumine est additionnée de caprylate de sodium, à une concentration de 0,012 à 0,015 g/g d'albumine, comme stabilisant pour la pasteurisation.

30

20.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que la solution d'albumine est soumise à une pasteurisation par un chauffage à plus de 60 °C pendant au moins 10 heures.

35

21.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que la solution d'albumine est soumise à un traitement d'inactivation virale par solvant-détergent et ne subit pas de pasteurisation.

40

22.- Solution d'albumine purifiée à usage thérapeutique caractérisée en ce qu'elle est obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21.

45

23.- Solution d'albumine purifiée utilisable pour des cultures cellulaires in vitro caractérisée en ce qu'elle est obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 et 21.

50

the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...

the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...

the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...

the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...

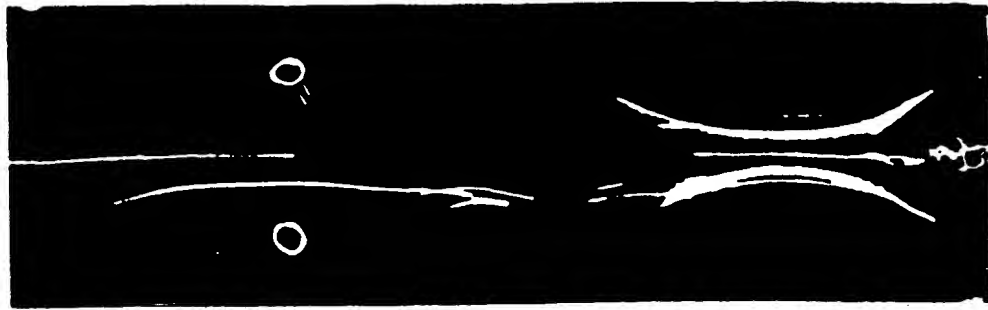
the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...  
 the 8 1/2 inch diameter...

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



FIGURE 1

A'



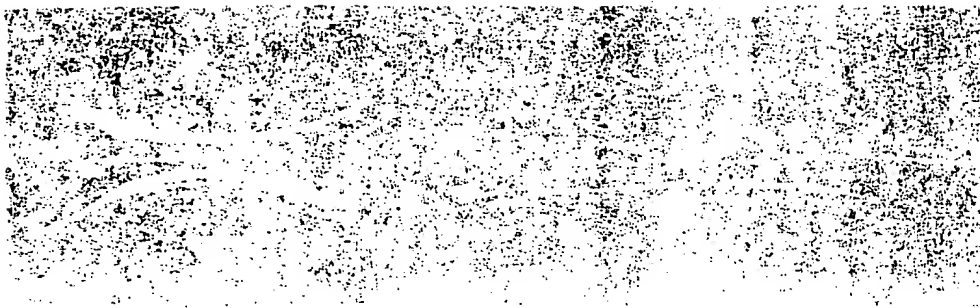
B'



C'



FIGURE 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 90 40 1459

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS  |  |   |   |
|--|--|---|---|
| Catégorie  | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes                  | Revendication concernée                         | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CL5)         |
| X  | EP-A-0 050 061 (E. SHANBROM)<br>* Page 5, lignes 10-20; page 9, ligne 14; page 16, lignes 4-16 * | 1-2   | C 07 K 3/28<br>C 07 K 15/06<br>A 61 K 37/02 |
| Y  | ---  | 3-23  |   |
| Y  | US-A-4 228 154 (J.D. FISHER et al.)<br>* Revendications *  | 3-23  |   |
| Y,D  | FR-A-2 327 256 (PHARMACIA FINE CHEMICALS AB)<br>* Revendications *                               | 3-23  |   |
| Y  | FR-A-2 322 871 (NEW ZEALAND INVENTIONS DEVELOPMENT INDUSTRY)<br>* Revendications *               | 3-23  |   |
|  |  |   | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5)   |
|  |  |   | A 61 K<br>C 07 K                            |
| Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications   |  |   |   |
| Lieu de la recherche<br>LA HAYE  |  | Date d'achèvement de la recherche<br>26-07-1990 | Examinateur<br>ALVAREZ Y ALVAREZ C.         |
| <b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b><br>X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br>A : arrière-plan technologique<br>O : divulgation non-écrite<br>P : document intercalaire<br>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br>& : membre de la même famille, document correspondant |  |   |   |

44-38861-43

[illegible]

**THIS PAGE BLANK**